

STIC-ILL

W355,098

From: Kerr, Janet
Sent: Thursday, July 12, 2001 1:20 PM
To: STIC-ILL
Subject: references for 09/457,931

Please order the following references:

Schleger et al.
Altex
18(1):5-8
2001

Prieto, P.
Science Of The Total Environment
247(2-3):349-354
2000

Genschow et al.
In Vitro & Molecular Toxicology
13(1):51-66
2000

Scholz et al.
Cells Tissues Organs
165(3-4):203-211
1999

Spielmann et al.
In Vitro Toxicology: Journal of Molecular and Cellular Toxicology
10(1):119-127
1997

Mummery et al.
Reproductive Toxicology
7(Suppl. 1):145-154
1993

Craig et al.
Biomarkers
1(2):123-135
1996

Webster, W.S.
Congenital Anom.
28(4):295-302
1989

Thanks,
Janet M. Kerr
A.U. 1633
305-4055
CM1-12A03

3728663

Möglichkeit der Nutzung von Zellkulturmethoden in der Arzneimittellentwicklung

Claudia Schleger, Niels Krebsfaenger, Arno Kalkuhl, Rainer Bader und Thomas Singer
Boehringer Ingelheim Pharma KG, D-Biberach

Zusammenfassung

Die für die Arzneimittellizenzierung notwendigen Tierversuche sind aufwendig, kostenintensiv und oft für die Tiere belastend. Daher ist es sinnvoll, mögliche Entwicklungskandidaten schon im Vorfeld mit Hilfe von in vitro Zellkultursystemen toxikologisch zu überprüfen. In vitro Zellkulturmethoden zeichnen sich im Vergleich zum Tierversuch durch geringen Substanzbedarf und eine relativ kurze Testdauer aus. Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit, mechanistische Fragestellungen beantworten oder humanspezifische Toxizität untersuchen zu können. Ein frühes toxikologisches Screening mit Zellkulturmethoden stellt daher eine wichtige Entscheidungshilfe bei der Auswahl potentieller Arzneimittelkandidaten dar.

Primäre Hepatozyten können für die Bestimmung der substanz-induzierten Zytotoxizität verwendet werden. Diese kann unter geeigneten Bedingungen als Maß für die allgemeine Toxizität verwendet werden. Endpunkte wie Apoptoseindex, Redoxstatus oder Genexpressionsmuster eignen sich für mechanistische Fragestellungen. Die Einbeziehung von primären humanen Hepatozyten ist eine wichtige Basis für die Extrapolation von experimentellen Befunden auf den Menschen.

Da teratogene Befunde im Tierversuch im allgemeinen den Abbruch der Entwicklung einer Substanz bedeuten, ist es sinnvoll, mit Hilfe eines in vitro Embryotoxizitätstests schon früh das teratogene Potential zu bestimmen. Hierfür eignet sich der von der ZEBET entwickelte Embryonale Stammzelltest (EST). Es wird die Fähigkeit embryonaler Stammzellen bestimmt, unter Substanzwirkung zu schlagenden Herzmuskelzellen zu differenzieren. Im Vergleich dazu werden die Zytotoxizität der Substanz auf die embryonalen Stammzellen einerseits sowie auf eine ausdifferenzierte Fibroblastenzelllinie andererseits gemessen. In einer von ECVAM initiierten Validierungsstudie zeigte der EST eine sehr gute Korrelation mit den in vivo Daten.

Summary: Innovative Cell Culture Methods in Drug Development

The animal studies necessary for drug registration are time-consuming, costly, and often stressful for the animals. Toxicological screening of drug candidates early in development with in vitro cell culture systems is therefore of relevance. In contrast to animal studies, in vitro cell culture methods are characterized by a low compound requirement and a short duration. Additionally it is possible to include mechanistic studies or to test for toxicity specific to humans. Therefore, early toxicological screening can provide a useful support for selecting the most promising drug candidate.

Primary hepatocytes can be used to measure the cytotoxicity of a test compound. These results can be used to estimate general toxicity. Measuring endpoints like apoptosis, redox status, or gene expression profiles can help to answer mechanistic questions. The use of primary human hepatocytes provides early predictivity for hepatotoxicity specific to humans.

Since teratogenic findings in animal studies often lead to abandonment of development, it is reasonable to use an in vitro embryotoxicity assay for early determination of the teratogenic potential of a compound, e.g. the embryonic stem cell test (EST) which was recently developed by ZEBET. In the EST embryonic stem cells are investigated for their preserved capability to differentiate into cardiomyocytes following drug exposure. In comparison cytotoxicity of the test substance is analyzed in embryonic stem cells and in differentiated fibroblast cells. In a validation study initiated by ECVAM the EST shows a high correlation with in vivo data.

Keywords: toxicity screening, primary hepatocytes, embryonic stem cell test

1 Einleitung

Die für die Arzneimittellizenzierung und -zulassung gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuche zur Bestimmung der akuten, subakuten und chronischen Toxizität, sowie des karzinogenen und teratogenen Potentials eines Arzneimittelkandidaten sind zum einen sehr aufwendig und kostenintensiv, zum anderen häufig belastend für

die Tiere. Dies macht es sowohl aus Gründen des Tierschutzes als auch zur Kosteneinsparung erforderlich, schon zu einem frühen Zeitpunkt in der Arzneimittellizenzierung möglichst erfolgversprechende Entwicklungskandidaten auszuwählen. Wichtige Parameter für diese Selektion sind die pharmakologische Wirkung einer Substanz, ihre pharmazeutischen Eigenschaften, Bioverfügbarkeit und Toxizität.

Zur frühzeitigen Abschätzung der Toxizität einer Substanz wird häufig in explorativen Versuchen eine kleine Anzahl von Tieren kurzzeitig mit den möglichen Arzneimittelkandidaten behandelt. Trotz der im allgemeinen hohen Prädiktivität von Tierversuchen ist es aber sinnvoll, für ein frühes toxikologisches Screening in vitro Zellkultursysteme zu etablieren, da zum einen bei Entwicklungsbeginn nur ge-

ringe Substanzmengen zur Verfügung stehen, und sich zum anderen explorative Tierstudien reduzieren lassen. Zusätzlich können diese *in vitro* Zellkultursysteme für mechanistische Fragestellungen oder die Abklärung humanspezifischer Toxizität genutzt werden.

Zwei Beispiele für Zellkulturmethoden - der Einsatz von primären Hepatozytenkulturen in der allgemeinen Toxikologie und die Verwendung von Embryonalen Stammzellen in der Reproduktionstoxikologie - werden hier vorgestellt.

2 Primäre Hepatozyten

Die Möglichkeiten, primäre Hepatozyten in der Arzneimittelforschung und Entwicklung einzusetzen, sind in der Literatur ausführlich beschrieben (Review-Artikel z.B. Castell et al., 1997; Gomez-Lechon et al., 1997). Dieses *in vitro* Modell erscheint für die Arzneimittelforschung besonders geeignet, da erstens die Leber ein häufiges toxikologisches Zielorgan ist, zweitens wegen der metabolischen Kompetenz von Hepatozyten auch die heute häufig verwendeten *Prodrugs* untersucht werden können und sich daher drittens auch Giftungs- oder Entgiftungsvorgänge, die in den Hepatozyten ablaufen, berücksichtigen lassen.

Die Extrapolation von Ergebnissen mit isolierten Zellen auf einen komplexen Organismus und somit die Relevanz für den Menschen ist selbstredend mit vielen Einschränkungen versehen und kann nur durch eine umfassende experimentelle Evaluierung erfolgen. In diesem Zusammenhang ist für die Arzneimittelsicherheit das MEIC-Programm „Evaluation of Acute Systemic Toxicity“ von Bedeutung. In dieser Studie wurde die Relevanz von *in vitro* Zytotoxizitätstests für die Prädiktion der akuten Toxizität beim Menschen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen *in vitro* Zytotoxizitätstests und der letalen humanen Serumkonzentration sowie die Korrelation zwischen Tierversuch (Ratte und Maus) und Mensch in etwa gleich war. Die Korrelation zwischen *in vitro* Methoden und der humanen Situation konnte durch eine isolierte Betrachtung von Substanzen mit vergleichbarem toxischen Effekt noch deutlich gesteigert werden (Ekwall et al., 1998).

Zur *in vitro* Untersuchung von subakuten oder chronischen Effekten lassen sich

primäre Hepatozyten im sogenannten „Sandwich-Verfahren“ kultivieren (Dunn et al., 1989). Dabei können die charakteristische polygonale Morphologie und die Polarität der Hepatozyten über einen Zeitraum von mehreren Wochen erhalten werden. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen einen Zytotoxizitätstest nach Behandlung von primären Hepatozyten der Ratte mit

stimmung von Apoptose- und Mitoserate. Zusätzlich zeigen hier neue Methoden wie z.B. *Microarrays* vielversprechende Möglichkeiten auf, da sie die parallele Genexpressionsanalyse mehrerer tausend Gene ermöglichen.

Der Vergleich primärer Hepatozyten von Ratte und Mensch ermöglicht die Untersuchung humanspezifischer Effekte.

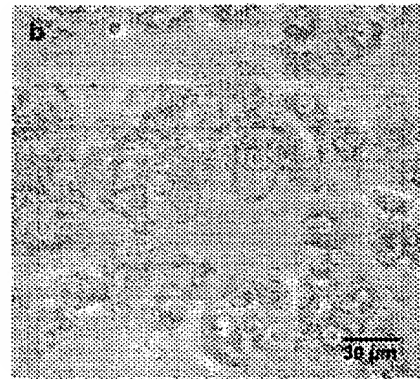
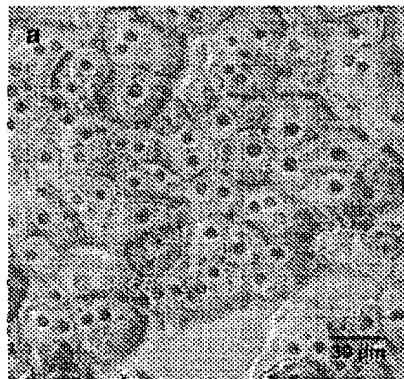


Abb. 1: Kollagensandwichkulturen von primären Rattenhepatozyten a) unbehandelte Kontrolle, b) nach Behandlung mit Allylalkohol (10 µg/ml) für zwei Tage.

Allylalkohol. Als Maß für die Zytotoxizität wurde die Freisetzung zellulärer Enzyme (*enzyme-leakage*) verwendet. Die Zytotoxizität von Allylalkohol steigt durch wiederholte Gabe deutlich an. Dieser Effekt ist auch bei anderen Testsubstanzen in unterschiedlichem Maße zu beobachten, wodurch bei längerer Behandlung die Substanzkonzentrationen den Serumkonzentrationen aus chronischen Tierversuchen nahe kommen können.

Zur Klärung mechanistischer Fragen können neben dem *enzyme-leakage* weitere spezifische Endpunkte betrachtet werden, wie z.B. die Albumin-Produktion, der Redox- und Energiestatus sowie die Be-

Zum Beispiel weisen klinische Daten bei dem Lipidsenker Clofibrat darauf hin, dass die bei der Ratte beobachtete Peroxisomenproliferation und damit verbundene Hepatokanzerogenität für den Menschen keine Rolle spielt. Interessanterweise zeigen auch *in vitro* kultivierte primäre humane Hepatozyten im Gegensatz zu primären Hepatozyten der Ratte keine typische *response* nach Behandlung mit Peroxisomenproliferatoren (z.B. Hildebrand et al., 1999). Ein weiteres Beispiel für die Spezifität ist das Herzglykosid Digoxin, das für den Menschen wesentlich toxischer ist als beispielsweise für Ratten. Humane Zellkulturen zeigen hier im Vergleich zu tierischen Modellen eine gute Prädiktivität, was auf die höhere Dichte der durch Digoxin gehemmten K^+/Na^+ ATPase in humanen Zellen zurückgeführt wird (Jover et al., 1992). Ein aktuelles Beispiel für Humanspezifität in der Entwicklung einer Tumorthherapie ist der *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), der in kultivierten humanen Hepatozyten Apoptose hervorruft. Dieser Effekt von TRAIL war in Tierstudien mit Mäusen und Primaten nicht beobachtet worden (Jo et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass primäre humane Zellen für die Forschung und Entwicklung von

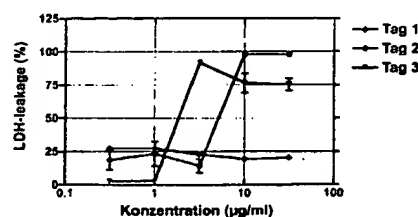


Abb. 2: Laktatdehydrogenase (LDH)-Leakage nach Behandlung von primären Hepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen Allylalkohol für ein, zwei oder drei Tage.

Arzneimitteln, die immer spezifischer auf molekulare Signalwege Einfluss nehmen, von großer Wichtigkeit sein können. Die Bedeutung speziesspezifischer Unterschiede in der Toxizität wird durch eine Reihe von Fällen unterstrichen, in denen bereits eingeführte Arzneimittel (Rezulin®, Trovan®, Tasmar®) wegen humaner Lebertoxizität wieder vom Markt genommen werden mussten. Hier wurden die im Tierexperiment beobachteten Effekte nicht als limitierend für die Entwicklung dieser Arzneimittel angesehen.

3 Der Embryonale Stammzelltest

Reproduktionstoxikologische Studien erfolgen im allgemeinen relativ spät in der Entwicklung eines Arzneimittelkandidaten. Teratogene Befunde führen jedoch in den meisten Fällen (abhängig vom vorgesehenen Indikationsgebiet) zum Abbruch der Entwicklung einer Substanz. Es ist daher wünschenswert, ein Testsystem zu besitzen, das schon frühzeitig Hinweise auf das teratogene Potential einer Substanz bietet.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von *in vitro* Embryotoxizitätstests entwickelt, wie z.B. ein Test an Froschembryonen (*frog embryo teratogenesis assay Xenopus*, FETAX; Bantle et al., 1999), ein Test an Rattenembryonen (*Rat Whole Embryo Culture Test*; Brown and Fabro, 1981; Schmid et al., 1983) und Tests an Kulturen embryonaler Gewebe, wie der *Micromass Test* (Flint, 1993). Ein weiterer *in vitro* Embryotoxizitätstest ist der von Spielmann et al. (1997) entwickelte Embryonale Stammzelltest (EST). Dieser besitzt den Vorteil, dass es sich hierbei um ein Säugerzellsystem handelt, jedoch keine trächtigen Tiere getötet werden müssen, da ausschließlich etablierte Zelllinien verwendet werden. Der EST macht sich zu Nutzen, dass embryonale Stammzellen (ES-Zellen) in Zellkultur unter geeigneten Bedingungen zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können. Im EST werden ES-Zellen der murinen Zelllinie D3 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, unter Substanzeinwirkung zu schlagenden Herzmuskelzellen zu differenzieren (Methode siehe Abbildung 3). Im Vergleich dazu wird die Wirkung der Testsubstanz auf die Überlebensfähigkeit einerseits der ES-Zellen, andererseits einer ausdifferenziertes Gewebe repräsentierenden 3T3-Fibroblastenzelllinie bestimmt.

Für den EST werden daher drei Endpunkte nach jeweils 10 Tagen Substanzbehandlung gemessen: (1) die Halbhemmkonzentration für die Inhibierung der Differenzierung der ES-Zellen zu schlagenden Herzmuskelzellen (50% inhibition concentration for differentiation, ID_{50}), (2) die mittels MTT-Tests bestimmte Zytotoxizität der Testsubstanz auf die ES-Zelllinie D3 (Halbhemmkonzentration IC_{50} D3) und (3) die Zytotoxizität auf 3T3-Fibroblasten (IC_{50} 3T3). Mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse wurde ein Prädiktionsmodell entwickelt, das aufgrund der Zahlenwerte der drei Endpunkte Testsubstanzen in drei Embryotoxizitätsklassen

deutlich höher, teilweise auch über der maximal verwendeten Konzentration von 1000 µg/ml. Die ES-Zellen sind gegenüber diesen Substanzen zum Teil sogar unempfindlicher als die Fibroblasten.

In einer von ECVAM initiierten und von der ZEBET koordinierten Prävalidierungs- und Validierungsstudie wurden der EST sowie der *Whole Embryo Culture Assay* und der *Micromass Assay* evaluiert. In der Validierungsstudie wurden 20 Substanzen mit bekanntem teratogenen Potential unter blinden Bedingungen in verschiedenen europäischen Laboratorien getestet. Der EST zeigte dabei eine korrekte Klassifizierung von 78% der getesteten Substanzen. Insbesondere für stark

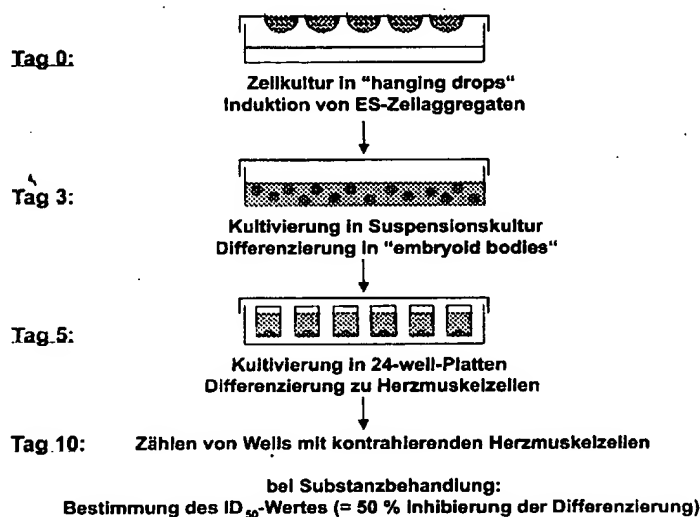


Abbildung 3: Der Embryonale Stammzelltest (EST): Testprinzip des Differenzierungsassays mit Embryonalen Stammzellen der Linie D3 (nach Spielmann et al., 1997).

(nicht, schwach und stark embryotoxisch) einstuft (Scholz et al., 1999).

In Abbildung 4 sind typische Dosis-Wirkungskurven am Beispiel der stark embryotoxischen Substanz 5-Fluorouracil sowie der nicht-embryotoxischen Substanz Ascorbinsäure gezeigt. Für stark embryotoxische Substanzen liegen die ID_{50} - und IC_{50} -Werte im allgemeinen bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die ES-Zellen sind dabei meist empfindlicher gegenüber der Wirkung der Substanzen als die Fibroblasten. Die Differenzierung wird häufig bei noch geringeren Konzentrationen gehemmt als das Wachstum der ES-Zellen. Bei nicht embryotoxischen Substanzen liegen dagegen die IC_{50} - und ID_{50} -Werte meist

embryotoxische Substanzen waren die Ergebnisse sehr überzeugend (Spielmann et al., 1998; weitere Publikationen in Vorbereitung).

Mit dem EST steht also ein Testsystem zur Verfügung, mit dem sich mit geringen Substanzmengen schon frühzeitig in der Entwicklung eines Arzneimittelkandidaten dessen embryotoxisches Potential untersuchen lässt. Darüber hinaus lassen sich ES-Zellen auch für weitergehende mechanistische Untersuchungen verwenden. ES-Zellen können unter entsprechenden Kulturbedingungen außer zu Herzmuskelzellen noch zu einer Reihe weiterer Zelltypen differenzieren, wie z.B. zu Nervenzellen, Muskelzellen und hämatopoetischen

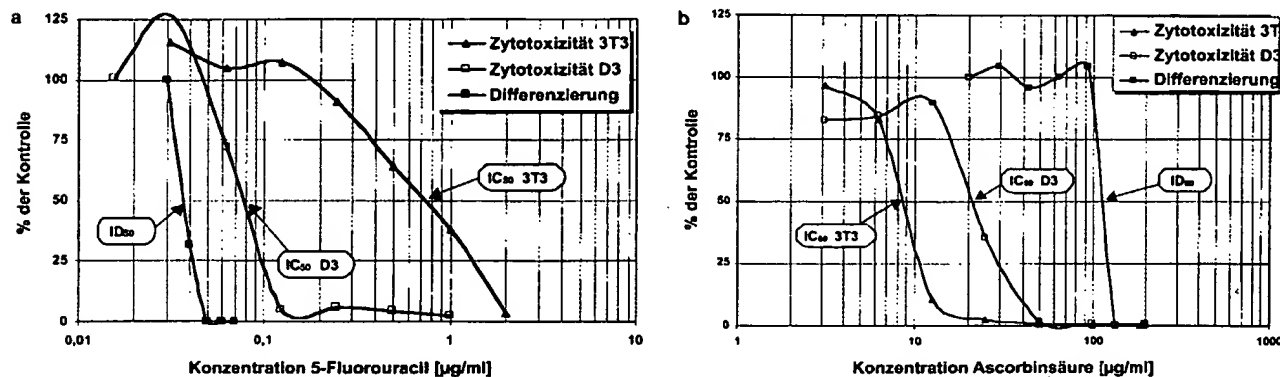


Abb.4: Typische Dosis-Wirkungskurven für die drei Endpunkte des ESTs: Zytotoxizität bei den embryonalen Stammzellen D3 und bei der Fibroblastenzelllinie 3T3 und Inhibierung der Differenzierung der D3-Zellen a) unter Verwendung der stark embryotoxischen Substanz 5-Fluorouracil, b) unter Verwendung der nicht embryotoxischen Substanz Ascorbinsäure.

Zellen. Der Einfluss einer Substanz auf diese Differenzierungswege kann daher an ES-Zellen beispielweise durch Bestimmung von Genexpressionsmustern untersucht werden.

4 Schlussfolgerung

Die Anwendung von Zellkulturmethoden wie dem Embryonalen Stammzelltest und primären Hepatozyten in der Arzneimittelentwicklung bringt eine Reihe von Vorteilen. Aufgrund des im Vergleich zum Tierversuch geringen Substanzbedarfs und der relativ kurzen Testdauer ermöglichen sie das frühe Screening einer größeren Zahl von Substanzen. Sie unterstützen daher die Auswahl der aus toxikologischer Sicht erfolgversprechendsten Entwicklungskandidaten und können somit zu einer Reduzierung von Tierversuchen führen. Außerdem lassen sich mit Hilfe von Zellkultursystemen zusätzliche Informationen zum Tierversuch gewinnen, da zum einen mechanistische Studien leichter möglich sind und zum anderen durch die Verwendung humaner Zellkultursysteme schon frühzeitig humanspezifische Toxizität untersucht werden kann.

Literaturverzeichnis

- Bantle, J. A., Finch, R. A., Fort, D. J. et al. (1999). Phase III interlaboratory study of FETAX. Part 3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system. *Journal of Applied Toxicology*, 19, 447-472.
- Brown, N. A. and Fabro, S. (1981). Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*, 24, 65-78.
- Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X., Bort, R. (1997). The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cellular Biology and Toxicology*, 13(4-5), 331-338.
- Dunn, J. C., Yarmush, M. L., Koebe, H. G. and Tompkins, R. G. (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB Journal*, 3(2), 174-177.
- Ekwall, B., Barile, F. A., Castano, A. et al. (1998). MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part VI. The Prediction of Human Toxicity by Rodent LD50 Values and Results From 61 *In Vitro* Methods. *ATLA* 26, 617-658.
- Flint, O. P. (1993). In vitro tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test. *Reproductive Toxicology*, 7 Suppl, 103-111.
- Gomez-Lechon, M. J., Donato, T., Ponsoda, X. et al. (1997). Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. In J. V.Castell and M. J. Gomez-Lechon, *In vitro Methods in Pharmaceutical Research* (129-154). San Diego: Academic Press.
- Hildebrand, H., Schmidt, U., Kempka, G. et al. (1999). An in vitro model for peroxisome proliferation utilizing primary hepatocytes in sandwich culture. *Toxicology in Vitro*, 13, 265-273.
- Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W. et al. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature Medicine*, 6(5), 564-567.
- Jover, R., Ponsoda, X., Castell, J. V. and Gomez-Lechon, M. J. (1992). Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems. *Toxicology in Vitro*, 6, 47-52.
- Schmid, B. P., Trippmacher, A. and Bianchi, A. (1983). Validation of the whole-embryo culture method for in vitro teratogenicity testing. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 11, 563-566.
- Scholz, G., Genschow, E., Pohl, I. et al. (1999). Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST) - a new in vitro embryotoxicity test. *Toxicology in Vitro*, 13, 675-681.
- Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B. et al. (1997). The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicology* 10, 119-127.
- Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A. et al. (1998). Ergebnisse der ersten Phase des ECVAM-Projektes zur Prävalidierung und Validierung von drei in vitro Embryotoxizitätstests. *ALTEX*, 15, 3-8.

Korrespondenzadresse

Dr. Claudia Schleger
Boehringer Ingelheim Pharma KG
Abt. Nichtklinische Arzneimittelsicherheit
Birkendorfer Str. 65
D-88397 Biberach
Tel: +49-7351-54 94 23
Fax: +49-7351-54 21 83